



Title	Effect of mesenchymal cells to rabbit oral epithelial-mesenchymal-muscular hybrid sheets
Author(s)	山根, 茂樹
Journal	, (): -
URL	http://hdl.handle.net/10130/3637
Right	

氏名	山根 茂樹
学位	博士（歯学）
学位記番号	第 2 0 8 1 号（甲 第 1294 号）
学位授与年月日	平成 2 7 年 3 月 3 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
論文審査委員	主査 田崎 雅和 教 授 副査 阿部 伸一 教 授 副査 井上 孝 教 授 副査 柴原 孝彦 教 授
学位論文名	Effect of mesenchymal cells to rabbit oral epithelial-mesenchymal-muscular hybrid sheets

学位論文内容の要旨

1. 研究目的

頬粘膜癌などによって広範な粘膜摘出後に、これまで前腕皮弁や腹直筋皮弁などといった再建方法が試みられているが、移植皮弁と筋層との接着が不十分なため、治癒後の咀嚼・嚥下機能障害という問題点が指摘されている。そこで、上皮、結合組織、筋肉の細胞シートをハイブリットさせた 3 層積層シートを開発し、生体におけるこれらの 3 層構造 *in vitro* で再現し、これらの構造維持に重要な細胞骨格、接着タンパクの局在を比較、検討した。

2. 研究方法

上皮シート作成のため、日本家兎口腔粘膜から細胞を採取した。同時に酵素処理により分離した結合組織由来の細胞をゲル状のコラーゲンと混和し、インサート上に播種した。この結合組織ゲルを feeder 細胞とし、上皮細胞と共培養を行った。筋シートは日本家兎の筋芽細胞を用いて作成した。両シートを積層し、通法に従い凍結切片を作製し、細胞骨格タンパク、接着タンパクの局在観察のため、免疫組織化学的染色、共焦点顕微鏡による観察、Western blot 法によるタンパクの定量化、RT-PCR 法を行った。また用いた、日本家兎のプライマルな細胞の観察のために、線維芽細胞、筋芽細胞それぞれに分化誘導をかけ、RT-PCR 法を行った。

3. 研究成績および結論

上皮シートが結合組織ゲルを介して、筋肉シートと密接な状態であることがわかった。また、それぞれのシートに生体と同様な中間径フィラメントの発現が確認された。上皮基底層、結合組織にコラーゲンや接着関連タンパクも観察されたことから、良好な積層シートが作製可能となった。積層後、継日的に上皮層、筋層の厚みが増加し、それぞれの構造タンパクにも変化があった。またプライマルで使用した結合組織由来の線維芽細胞、筋組織由来の筋芽細胞はともに、多分化能のある、未分化な細胞だということがわかった。

最終試験の結果の要旨および担当者

報 告 番 号	甲 第 1 2 9 4 号	氏 名	山根 茂樹
最終試験担当者	主 査 田崎 雅和 教 授 副 査 阿部 伸一 教 授 井上 孝 教 授 柴原 孝彦 教 授		
最終試験施行日	平成 2 6 年 5 月 2 0 日		
試 験 科 目	解剖学		
試 験 方 法	口頭試問		
試 験 問 題	主題ならびに関連問題		
<u>結果の要旨</u> 本審査委員会は主題ならびに関連問題について最終試験を行った結果、十分な学識を有することを認め、合格と判定した。			

学位論文審査の要旨

本論文は、日本家兎の頬粘膜組織から採取した上皮細胞、上皮下結合組織由来の線維芽細胞、筋芽細胞を用いて、細胞シートを作製し、積層させ、*in vivo* におけるこれらの構造 *in vitro* にて再現し、この積層シートにおける組織的観察、タンパク局在観察のため、H-E 染色、免疫組織化学的染色、共焦点レーザー顕微鏡による観察、RT-PCR 法、Western-blot 法を行ったものである。また、上皮下結合組織由来の未分化な線維芽細胞や、筋組織から採取した筋芽細胞の多分可能を調べ、積層シートの維持との関わりについて考察を行った。

その結果、上皮層、間葉層、筋層と3層の良好な積層シートが完成し、それぞれの層において細胞骨格関連タンパクおよび接着タンパク、また細胞の恒常性を保つ未分化な細胞のマーカーが維持されているのを確認した。上皮下結合組織由来の間葉系の細胞、及び筋芽細胞はそれぞれ多分化能があり、間葉系の幹細胞である可能性の一旦が示唆された。

本審査委員会では、本研究の妥当性、論文の解釈などを中心に以下のような質疑が行われた。1) 線維芽細胞と筋芽細胞の分化の差について、2) 論文の新知見について、3) Niche 細胞の役割について、4) 移植を目的にした際の、組織の厚さについて、5) 移植片の血液供給について、6) 移植片の神経支配について、などが主な質問であった。これらの質問に対する回答として、1) 今回使用した線維芽細胞、および筋芽細胞は未分化な間葉系の細胞であるが、筋芽細胞が線維芽細胞に比べ分化が進んでいることが示唆された。2) 新知見としては、筋層を含めた3層構造の細胞シートの作製方法の確立である。間葉系の細胞が上皮のみならず、筋の分化にも影響を与えている。3) 細胞分化の環境を維持する役割をもつ。4) 筋層は筋管まで分化させずに、未分化な筋層の状態での移植の方が、生着が良好なのではないかと考えている。5) 血管内皮細胞を筋層に混在させ、共培養することで血管を作製しようと考えている。6) 上皮下結合組織由来の間葉系の幹細胞が神経終末に分化したという報告があるため、今後検討し、実験を行う予定である。以上が本審査委員会での主な質問と回答である。また、論文の文章構成や英語表現などについての指摘があり、修正が行われた。その結果、本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定された。